PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2015, 42(10): 935~946
www.pibb.ac.cn

利用串联亲和纯化的方法筛选耻垢分枝杆菌中 MutM 的相互作用蛋白*

范尚华[1, 2)] 周 盈[2)] 张泓泰[2)] Joy Fleming[2)] 喻子牛[1)] 张先恩[2)**] 毕利军[2)**]

([1)] 华中农业大学生命科学技术学院，农业微生物学国家重点实验室，武汉 430070；
[2)] 中国科学院生物物理研究所，中国科学院核酸生物学重点实验室和生物大分子国家重点实验室，北京 100101)

摘要 MutM(formamidopyrimidine-DNA glycosylase，Fpg)是原核生物碱基切除修复系统(BER)中同时具有 DNA 糖苷酶和脱嘌呤 / 脱嘧啶 AP 裂解酶活性的一种双功能酶，不但可以识别 DNA 损伤，而且能切除损伤的碱基，从而参与到许多种损伤的修复过程．除了高致突变率的 8- 羟基鸟嘌呤(8-oxoguanine，8-oxoG)外，MutM 在其他损伤修复中具体作用机制还不清楚．本研究主要以耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)为研究对象，利用串联亲和纯化技术和质谱相结合的方法对可能与 MutM 相互作用的蛋白因子进行发现和鉴定，并于体外用 Far-western 和 GST pull-down 方法对鉴定出的蛋白 DEAD-box rna helicase、RpsC、UvrA 与 MutM 的相互作用进行了验证．实验结果表明，利用串联亲和纯化方法来发现 MutM 相互作用的蛋白是切实可行的．本研究为进一步深入研究 MutM 在其参与的损伤修复中的具体机制提供了切入点．

关键词 耻垢分枝杆菌，碱基切除修复，MutM，串联亲和纯化
学科分类号 Q5，Q7 **DOI**: 10.16476/j.pibb.2015.0065

对于所有活的生物体，保持基因组的稳定性是至关重要的，但每个生物体又不可避免会受到来自各种致突变因素的影响，外源的如辐射、化学诱变剂等，内源的如活性氧类物质 (ROS)、活性氮 (RON) 等．这些因素可以改变 DNA 碱基的结构特性，从而造成 DNA 损伤．为此，生物体在进化过程中建立了不同的 DNA 修复途径，包括错配修复 (MMR)、核苷酸切除修复(NER)、碱基切除修复 (BER)、重组修复和 SOS 效应等[1]．其中碱基切除修复对由氧化、烷基化和去氨基化等造成的范围较广的小损伤修复起着主导作用[2]．这些特定损伤的去除是由一类糖基化酶来执行的[3]．Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (MutM，或 Fpg) 就是这些糖基化酶中的一种，它在原核生物中称为 MutM 或 Fpg，在真核生物中称为 OGG1．其主要参与碱基切除修复的起始，并且对许多损伤有修复作用．目前研究最清楚的是 MutM 对 8-oxoG (8-oxoguanine)的修复．8-oxoG 是由于活性氧(ROS)攻击 DNA 链中的鸟嘌呤，使之氧化而产生[4]，它是一种致突变的 DNA 损伤，既可以与 C 配对，也可以和 A 进行配对，后者的发生可以导致 G:C 到 T:A 的颠换．大肠杆菌中有 3 种 DNA 糖基化酶参与到 8-oxoG 的修复，它们分别为 MutT、MutY 和 MutM，三者在 8-oxoG 修复过程中的催化机制不同．MutT 负责将单独的 8-oxo-dGTP 水解为 8-oxo-dGMP，可防止 8-oxoG 在 DNA 复制时进入基因组，MutY 则切除与 8-oxoG 错配的 A 以减少错误蔓延，以上两种都不能切除 DNA 链中 8-oxoG，只有 MutM 具有这种能力[5]．MutM 在

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB910302)和国家科学自然基金 (31400127) 资助项目.
** 通讯联系人.
毕利军. Tel: 010-64888464, E-mail: blj@ibp.ac.cn
张先恩. Tel: 010-64888148, E-mail: zhangxe@sun5.ibp.ac.cn
收稿日期：2015-03-12，接受日期：2015-07-20

8-oxoG 修复中发挥多种催化活性，它不但具有识别 8-oxoG 的能力，使脱氧核糖磷酸链发生糖基化，以便产生单链断裂，而且对 8-oxoG 具有切割活性，产生 AP 位点[6]，MutM 的失活会使自然突变率急剧升高[7].

除了可以对 8-oxoG 进行有效修复外，MutM 还可参与到许多不同类型损伤的修复中，如 5-甲酰基尿嘧啶(5-formyluracil， 5-foU) [8]、Guanidinohydantoin(Gh)、spiroiminodihydantoin(Sp)[9]、错误重组[10]、FapydG[11]和 C/C 错配[12-13]等．但是 MutM 在这些损伤中具体的催化机制还不清楚，如虽然发现 MutM 参与到 C/C 错配的修复中，具有结合 C/C 错配的能力，但是无法有效地修复 C/C 错配，因此推测 C/C 错配的修复可能需要别的蛋白质因子参与．已有文献报道[10]显示，MutM 在减少错误重组发生几率方面也发挥着重要的作用，MutM 是怎么发挥作用的，这些问题的解答还需要进一步的研究．特别对于分枝杆菌属，无论是慢速生长菌(如结核分枝杆菌)，还是快速生长菌(如耻垢分枝杆菌)，它们的基因组中都未发现 MMR 途径相关基因的存在[14]；另外分枝杆菌基因组 GC 含量普遍很高，发生 C/C 错配的几率较其他物种高得多．所以在分枝杆菌中研究 MutM 以及与其相互作用的蛋白质有特殊的意义.

了解一个蛋白质具体作用机制，寻找与它有相互作用的蛋白质是一个重要的手段．Rigaut 和 Seraphin 等[15]于 1999 年首先提出了 TAP 技术，特别适用于研究蛋白质在生理条件下的相互作用．该技术通过基于同源重组的基因工程技术在靶蛋白一端嵌入一个纯化标签 (TAP tag)，不破坏靶蛋白序列，且靶蛋白和 TAP tag 融合后的蛋白质表达量与体内水平相当；经过两步连续的亲和纯化获得接近自然条件的特定蛋白质复合体，然后通过质谱技术进行蛋白质鉴定，与免疫共沉淀等传统的研究蛋白质相互作用的技术相比，TAP 技术具有周期短、假阳性结果少等优点.

耻垢分枝杆菌作为一种快速生长并且不致病的分枝杆菌，是研究分枝杆菌属特别是结核分枝杆菌的一种重要的模式生物．为弄清楚 MutM 的具体作用机制，我们利用最近发展起来的分枝杆菌重组系统[16]将 TAP tag 插到耻垢分枝杆菌基因组 MutM 基因的 3′端，使用串联亲和纯化的方法对 MutM 相互作用的蛋白质进行了筛选和质谱鉴定，同时将部分蛋白质纯化出来，并用 Far western 和 GST pull-down 方法对 MutM 与这些蛋白质间的相互作用进行了体外验证．我们的研究为进一步阐明 MutM 在各种损伤修复中的作用机制提供了理论基础和切入点.

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株、质粒、培养基和生长状态

本研究所涉及到的菌株和质粒见表 1，其中大肠杆菌在 LB 培养基中培养，对于大肠杆菌的固体培养，需要在 LB 培养基中加入 1.5%的琼脂．耻垢分枝杆菌在 7H9 液体培养基或者 7H10 固体培养基中培养，或者根据需要在加入 0.5% (*v*/*v*)甘油和 0.05% Tween-80 的 LB 培养基中培养．根据需要，在相应的培养基中还要加入氨苄青霉素(Amp)，卡那霉素(Kan) 或 潮霉素(Hyg)，它们的终浓度分别为 100、60 和 50 mg/L.

Table 1　Strains and plasmids used in this study

Name & relevant characteristics	Ref./source
Strains	
E. coli BL21(DE3)	Save in the lab
M. smegmatis MC2 155	Save in the lab
M. smegmatis MC2 155/pJV53	Save in the lab
M. smegmatis MC2 155/MutM-TAP tag	Present study
M. smegmatis MC2 155/pSMT3-TAP tag	Present study
Plasmids	
pET20b	Save in the lab
pET20b-*up-TAP*	Present study
pET20b-*up-TAP-down*	Present study
pET20b-*up-TAP-hyg-down*	Present study
pET28a	Save in the lab
pET28a-*MutM*	Present study
pET28a-*MutM-sbp tag*	Present study
pET28a-*UvrA*	Present study
pET28a-*rna Helicase*	Present study
pET28a-*RpsC*	Present study
pET28a-*sbp tag*	Present study
pGEX-6P-1	Save in the lab
pGEX-6P-1-*MutM*	Present study
pSMT3	Save in the lab
pJV53	Save in the lab
pBS1539	Save in the lab

1.1.2 试剂

IgG Sepharose 6 Fast Flow、Calmodulin affinity resin、蛋白质银染试剂盒和 ECL Advance Western Blotting Detection Kit 购自 GE 公司. AcTEV 蛋白酶购自 Invitrogen 公司. PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品. 硝酸纤维素膜和碱性磷酸酶显色试剂盒购自北京鼎国生物公司. 蛋白质浓度测定试剂盒为 Bio-Rad 公司产品. KOD DNA 聚合酶为 TOYOBO 公司产品. T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 NEB 公司. BSA(牛血清白蛋白)和潮霉素 B 均为罗氏公司产品. 琼脂糖、琼脂粉、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG、丙烯酰胺、PMSF 和 N，N′- 亚甲基双丙烯酰胺均为 AMRESCO 公司产品. 蛋白胨和酵母提取物购自 OXOID 公司. Protein marker 为 GenStar 公司产品. 7H9 和 7H10 培养基为 BD 公司产品. 碱性磷酸酶 - 链霉亲和素偶联物为 Promega 公司产品. Strep-Tactin Sepharose 购自 IBA 公司. 寡核苷酸引物由上海生工公司合成.

1.2 含 TAP 标签敲入片段的构建

本研究主要利用 overlap PCR 技术和酶切连接相结合的方法获得 TAP tag 敲入基因组所需要的 cassette (图 1)，具体操作步骤如下：分别以质粒 pBS1539 为模板扩增出 *TAP tag* 基因，以质粒 pSMT3 为模板扩增出潮霉素基因 *hyg*，从耻垢分枝杆菌基因组中分别扩增 *MutM* 基因的 5′端 307 bp 片段和 3′端非编码区 300 bp 片段(分别简称为 *up* 和 *down*). 通过 overlap PCR 将其中的 *MutM* 基因的 5′端 307 bp 片段和 *TAP tag* 基因连接起来，形成 *up-TAP* 片段，并把该片段通过酶切连接的方式连接到载体 pET20b 上，形成 pET20b-*up-TAP* 克隆子. 再利用酶切连接的方法，将潮霉素基因 *hyg* 及 *MutM* 基因的 3′端 300 bp 非编码区片段分别连到 pET20b-*up-TAP* 质粒 up-TAP 片段的 3′端，最终构建出含敲入片段的质粒 pET20b-*up-TAP-hyg-down*. 通过酶切或者 PCR 的方法，得到含上述 4 个片段的全序列，形成敲入 TAP tag 所需的 cassette. PCR 扩增所用到的寡聚脱氧核糖核酸片段见表 2.

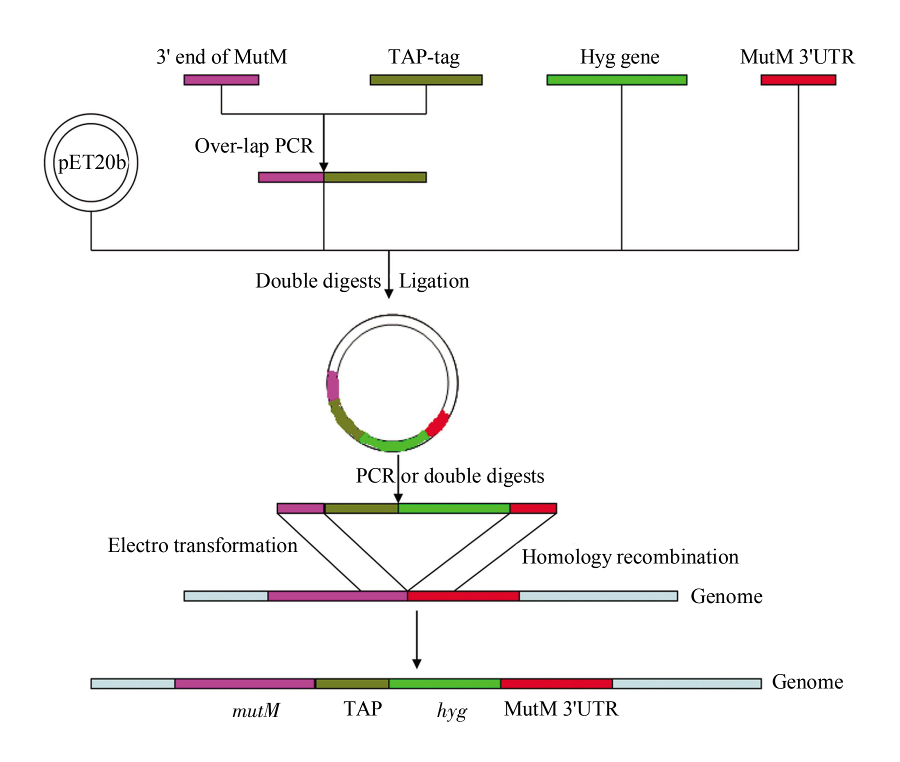


Fig. 1 Strategy for the construction of a TAP-tag knock-in cassette and its integration into the 3′ end of *mutM* in the *M.smegmatis* genome

The TAP-tag knock-in cassette was constructed by overlap extension PCR, double digestion and ligation. During overlap PCR, an up-TAP cassette was generated by fusing together the 3′ end of the *mutM* and TAP-tag (TAP) gene using primer Up-1 and TAP-2. The up-TAP cassette was then cloned into a pET20b plasmid to generate the pET20b/up-TAP. The 3′ UTR of *mutM* and the hygromycin gene (*hyg*) were respectively cloned into pET20b/up-TAP generating plasmid pET20b/up-TAP-Hyg-down. The full-length TAP-tag knock-in cassette was obtained using PCR or double digestion of pET20b/up-TAP-Hyg-down and was knocked into the genome at the end of *mutM* by electrotransformation and recombineering.

Table 2 Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence (5′-3′) (Restriction Enzyme cutting site indicated in bold)
Primers used for generating the TAP-tag knock-in cassette	
Up-1	GCC**GGGATCC**CCTGTGGCGCACGAAGAT (*Bam*HⅠ)
Up-2	AGAAAAAGGTAGAAGAGAAAAGGTA GACCCGAGGCACCCGC
TAP-1	GCCGCGTCCGCGGGTGCCTCGGGTCATGGAAAAGAGAAGATGG
TAP-2	GCCC**AAGCTT** CAGGTTGACTTCCCCGC (*Hin*dⅢ)
Hyg-1	GCCC**AAGCTT** GACTTGCTTAATCAGTGAGGCAC (*Hin*dⅢ)
Hyg-2	ATAAGAAT**GCGGCCGC** CTGTCCTCGTTGATCCTTGCC (*Not*Ⅰ)
Down-1	ATAAGAAT**GCGGCCGC**CAGGTCGGTGGCAGCCGATC (*Not*Ⅰ)
Down-2	TCC**GCTCGAG**CCGCGCTGGACAACTACTTCTGTG (*Xho*Ⅰ)
Primers used for PCR analysis of TAP-tag knock-in strains	
a	AACTGCTGGACCAGACCGTGGTGT
b	CAGCGGACCTCTATTCACAGGGTACG
c	AGGCCCTGGCATCCTCGATCATC
d	CTCAAGCAACAAGAAGGGCCTCATCAT
Primers used in expression plasmid construction	
MutM-1	GGAATTC**CATATG**ATGCCTGAGCTTCCCGAG (*Nde*Ⅰ)
MutM-2	CCG**GAATTC**TCCGACCCGAGGCACCC (*Eco*RⅠ)
UvrA-1	GGAATTC**CATATG**TTGGCTGACCGTCTTGTTGTC (*Nde*Ⅰ)
UvrA-2	CCG **GAATTC**TGTTGTTCGGTTAGGCGCTGA (*Eco*RⅠ)
RpsC-1	GGAATTC**CATATG** GTGGGCCAGAAGATCAATCC (*Nde*Ⅰ)
RpsC-2	CCG **GAATTC**TGAGCTCTCCGTGCTCTCG (*Eco*RⅠ)
rna helicase-1	GGAATTC**CATATG** ATGACCTCGCAAGAACCGGATC (*Nde*Ⅰ)
rna helicase-2	CCG **GAATTC**TCACTTCACCTTCCGGTGTG (*Eco*RⅠ)

1.3 耻垢分枝杆菌感受态细胞的制备[17-18]和电转

将新鲜保存的野生型耻垢分枝杆菌于 7H10 固体培养基上划线培养，3 d 后，挑取单菌落接种于 5 ml 7H9 培养基(含有 ADC)中，37℃ 振荡培养 2 d；按 1∶100 的比例将培养物接种于 200 ml 7H9 培养基(含有 ADC)中，37℃ 过夜培养，至 A_{600} 为 0.6 左右；将培养物于冰上放置 30 min，然后 4℃ 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体；倒掉上清，将菌体用 100 ml 预先冰浴预冷的 10%无菌甘油重悬，于 4℃ 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体；重复清洗菌体 3 次，所用的 10%甘油体积依次减为原培养体积的 1/4、1/8 和 1/10，最后加入 10 ml 预冷的 10%甘油，混匀菌体后，以 0.4 ml/ 管进行分装，保存于−80℃ 或立即使用.

将 DNA 加入 400 μl 的耻垢分枝杆菌感受态细胞中，冰上孵育 10 min，然后转入电转杯中(冰上预冷). 擦净电转杯外壁上的水，然后电击，电击时参数设置为：电压 2.5 kV，电阻 1 000 Ω，电容 25 μF. 电击完后，立即加入 1 ml 的 LB 或 7H9(含有 ADC)液体培养基，冰上放置 10 min. 37℃ 振荡培养 4 h，5000 r/min 离心 10 min，去掉大部分上清，剩余 100～200 μl 涂平板，使用 LB 固体培养基或 7H10 (含有 ADC) 固体培养基(相应的抗性)培养 3～5 天. 然后挑取单克隆验证.

1.4 TAP 纯化 MutM 蛋白

挑取新鲜的重组成功的单克隆 *M. smegmatis* MC2 155/MutM-TAP tag 接种于 5 ml 的 LB+Kan+Hyg 培养基中，37℃ 振荡培养长到饱和(2～3 天)，接种于 1 L 的 LB+Kan 培养基中，37℃ 培养 2～3 d (A_{600}～3). 收集菌体，用预冷的裂解缓冲液洗 1 次，再将菌体用预冷的 50～100 ml 的裂解缓冲液重悬，加入蛋白酶抑制剂 PMSF，使其终浓度为

1 mmol/L，进行超声破碎和高速离心，将上清转移至干净的新管中．吸取 200 μl 的 IgG Sepharose 玻璃珠悬浮液，转入 0.8 cm × 4 cm 的 Poly-Prep 柱子中，用 10 ml 裂解缓冲液洗 3 次．然后将细胞提取液上清转移到平衡好的柱中，重复过柱 2～3 次．再用 10 ml 裂解缓冲液洗 3 次．接着用 10 ml TEV 缓冲液洗 2 次，最后 1 次不要流的太干，用塑料小帽堵住出口．接着加入 500 μl TEV 缓冲液以及 100 U TEV 蛋白酶，混匀，4℃ 孵育过夜．次日从摇床取出柱子，静置 10 min 后，打开出口，用 EP 管收集流出液．在流出液中加入 500 μl CBP 结合缓冲液，3 μl 1 mol/L 的 $CaCl_2$ 和已用 CBP 结合缓冲液平衡过的 200 μl 钙调蛋白(calmodulin)玻璃珠，于 4℃ 孵育 2 h 后，用 10 ml CBP 结合缓冲液洗 3 次，然后加入 1 ml CBP 洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白，分 5 次加入分开收集，每管 200 μl，通常洗脱峰出现在第 2 管和第 3 管.

1.5　银染与质谱鉴定

由于 TAP 纯化出来的蛋白质溶液体积较大，而且本身蛋白质浓度很低，所以一般在 SDS-PAGE 检测前需要先进行浓缩．可采用 TCA(三氯乙酸)沉淀或者丙酮沉淀来浓缩蛋白，本次实验采用后一种方案，因为操作更简单，蛋白质损伤也较小．首先向洗脱的 200 μl 蛋白质溶液中加入 3～5 倍体积的冰预冷丙酮，混匀后，–20℃ 放置 2～4 h 或过夜沉淀；蛋白质沉淀好后，于 4℃ 16 000 r/min 离心 15 min，用 1 ml 预冷的丙酮洗蛋白沉淀 2 次．然后置于空气中干燥，去除丙酮后，加入 10 μl 双蒸水，重悬后加入 2.5 μl 6×蛋白上样缓冲液，沸水煮样 10 min．高速离心后上样，SDS-PAGE 分离蛋白样品．用蛋白质银染试剂盒染胶．蛋白胶银染后，从中挖出差异条带，用胰酶酶解后，将获得的肽段用液质联用仪 Maldi-tof 质谱仪进行分析鉴定．最后把得到的肽段序列与 NCBI 耻垢分枝杆菌蛋白质序列数据库对比检索.

1.6　蛋白质表达纯化

1.6.1　His 标签融合蛋白的表达

分别挑取最新活化的表达菌株于 5 ml LB试管培养基中，加入相应的抗生素，于 37℃、200 r/min 振荡培养过夜．次日，按 1%接种量分别转接于 500 ml 加入了抗生素的 LB 培养基中，继续 37℃、200 r/min振荡培养．待菌液 A_{600} 达到 0.4 时，加入诱导剂 IPTG 使其终浓度达到 0.2 mmo/L，同时将菌液转移到 16℃ 低温培养．诱导 12～16 h 后，4℃ 4 500 r/min 离心收集菌体，并用缓冲液 A(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9，500 mmol/L NaCl，5 mmol/L imidazole)清洗 1 次，然后重悬于 50 ml 缓冲液 A 中，超声破碎，以 12 000 r/min，离心 30 min，上清流经缓冲液 A 平衡的 Ni^{2+}-NTA 亲和层析柱，然后依次用缓冲液 A、B(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 500 mmol/L NaCl, 60 mmol/L imidazole)、C(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9，500 mmol/L NaCl，200 mmol/L imidazole)洗脱，根据蛋白质检测仪的读数收集洗脱物．SDS-PAGE 检验纯度后用 2 L 透析缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl，pH 7.9，NaCl 150 mmol/L，5% 甘油)进行透析．透析好的蛋白质样品用离心超滤管浓缩，在 12 000 r/min 离心 15 min 后，取上清保存.

1.6.2　SBP 标签融合蛋白的纯化

SBP-tag 亲和纯化系统的基本原理类似于众所周知的 biotin 和 streptavidin 之间的结合反应，SBP-标签是一种新的链霉亲和素结合肽，由 38 个氨基酸组成[19]，与 streptavidin 的解离常数为 2.5 nmol/L．带有 SBP 标签的蛋白可用固化 streptavidin 进行纯化，洗脱条件非常温和，使用 2 mmol/L 生物素即可将结合的 SBP 融合蛋白洗脱下来.

将 *E. coli* BL21/pET28a-*sbp* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*MutM*-*sbp tag* 等菌株按照上面的方法进行诱导表达，离心收集菌体，用缓冲液 D (50 mmol/L Tris pH 7.9，150 mmol/L NaCl，1 mmol/L EDTA)清洗菌体 1 次，然后重悬于 50 ml 缓冲液 D 中，超声破碎后，以 12 000 r/min，离心 30 min，上清上样于经缓冲液 D 平衡的链霉亲和素琼脂糖 beads 层析柱．接着用 10 倍柱体积的缓冲液 D 洗柱 3 次．然后用 3 倍柱体积的缓冲液 E(50 mmol/L Tris pH 7.9, 2.5 mmol/L desthiobiotin, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA)洗脱目的蛋白并进行收集，将纯化的蛋白质进行透析、浓缩、SDS-PAGE 检测和保存.

1.6.3　GST 融合蛋白的纯化

按照 **1.6.1** 的方法对 *E. coli* BL21/pGEX-6p-1-*MutM* 进行培养和诱导表达．离心收集的菌体用 1×PBS 清洗 1 次，然后重悬于 30 ml 含 0.1%(*v*/*v*) Triton X-100 的 1×PBS 中．超声破碎之后，16 000 r/min 离心 30 min，取上清液与 1 ml 处理好的 glutathione-Sepharose 4B 柱材料混合，4℃ 孵育 1 h．将样品以 500 r/min 离心 5 min，稍静置，将

上清转移走．用新鲜的 PBST 重悬柱料，在混合器孵育 5 min，再次以 500 r/min 离心 5 min，去掉上清．如此重复 3 次后，将柱料转移到一个小型蛋白质纯化柱中．将配制好的洗脱液(10 mmol/L 还原型谷胱甘肽溶液)加入到蛋白质纯化柱中，封闭出口，将其静置 10 min，然后打开出口，收集流出液，即为目的蛋白 GST-MutM.

1.7 Far western

将质谱鉴定的与 MutM 有相互作用的蛋白质以及作为阴性对照的 BSA 和 GST 进行梯度稀释，使每种蛋白质的终浓度分别为 8、2、0.5 μmol/L 和 0，按从左到右的顺序分别点样到硝酸纤维素膜上．将这个膜用溶液 F(25 mmol/L Tris-HCl pH 7.6，150 mmol/L NaCl，5% (*w*/*v*) non-fat milk，1 mmol/L EDTA) 在室温下封阻 2 h，然后加入 MutM-SBP 蛋白液，使其终浓度为 16 μmol/L，室温下孵育 1 h，分别用溶液 E (25 mmol/L Tris-HCl pH 7.6，150 mmol/L NaCl，0.05% Tween-20) 和不含 Tween-20 的溶液 E 各洗 3 次后，加入以 PBS 按 1∶3 000 稀释的碱性磷酸酶 - 链霉亲和素交联物 (alkaline-phosphatase conjugated strepavidin)，使酶和蛋白质通过 strepavidin 和 SBP 结合在一起，室温孵育 1 h 后按照上述的方法洗膜 6 次．最后加入显色底物 BCIP/NBT 并且在 37℃下显色，拍照.

1.8 GST pull-down

将 GST-MutM 与目的蛋白各取 0.1 nmol/L，加入到装有 600 μl PBST 的 EP 管中．同时，平行试验中将 GST 与目的蛋白各 0.1 nmol/L也混合孵育．将以上两个 EP 管于 4℃孵育 2 h，而后加入准备好的 glutathione-Sepharose 4B 柱材料，继续孵育 1 h. 离心收集 beads，加入 600 μl PBST，充分混匀后，再次离心收集 beads，重复 4 次．将 beads 与适量蛋白上样缓冲液混合，100℃ 煮 5 min，离心 3 min．通过 SDS-PAGE 分离如上制备的蛋白样品，以抗 His 标签的抗体为一抗，用 Western blotting 检测目的蛋白.

1.9 Western blotting

由于在基因组上 *MutM* 基因的 C 端整合了一段外源序列，基因组的部分结构可能发生改变．为了验证基因敲入菌株是否能正确表达带有 TAP-tag 的 MutM 蛋白，我们利用抗 TAP-tag 的抗体检测 MutM 和 TAP tag 融合表达情况.

挑取新鲜的已经通过 PCR 验证 *MutM* 基因 3′端成功整合了 TAP-tag 的单菌落，接种于 5 ml LB+Kan+Hyg 培养基中，37℃振荡培养到饱和，离心收集菌体，加入 100 μl 蛋白缓冲液和 20 μl 蛋白上样缓冲液，煮沸 10 min，高速离心后，吸取 10 μl 上样，SDS-PAGE 分离样品．然后利用半干转膜仪将 SDS-PAGE 胶上的蛋白转移到硝酸纤维素(NC)膜上，电压 15 V，转膜 40 min．将转印好的 NC 膜转移到含有 5%脱脂奶粉的封闭缓冲液中，室温封闭 1 h 或 4℃封闭过夜．用 PBST 洗膜 3 次，每次 5 min．洗好后置于杂交带中，加入 1∶2 000 稀释的一抗然后封上口，杂交带放置摇床上，4℃过夜孵育．接着用 PBST 洗膜 5 次，每次 5 min，然后加入 1∶5 000 稀释的二抗，室温孵育 1～2 h. 接着用 PBST 洗膜 5 次，每次 5 min．然后用吸样器吸取 1∶1 配置好的化学显色底物 0.5～1 ml，均匀地涂在膜上转印蛋白的一面．然后置于暗室用压片盒压片曝光，曝光时间长短根据信号强弱而定，一般 3 s 至 1 min 左右，底片曝光后置于显影液中 1 min 左右，取出放在水中轻轻漂洗一下，然后置于定影液中 1 min 左右，取出用水冲洗干净，晾干保存，做标记并拍照.

2 结果与分析

2.1 在基因组上 *MutM* 基因的 C 端敲入 TAP-tag 片段

以耻垢分枝杆菌基因组为模板成功扩增出 *MutM* 基因 3′端 307 bp 的 DNA 区段，以 pBS1539 质粒为模板扩增出 TAP 标签编码基因，大小约为 552 bp，通过 overlap PCR 技术将二者连接起来获得 up-TAP 片段，再经过酶切连接的方式将 up-TAP 连接到载体 pET20b 上，形成重组质粒 pET20b-*up-TAP*，我们通过单双酶切(图 2a)和测序验证构建成功．然后，通过酶切连接的方法把 *MutM* 基因的 5′端 300 bp 非编码区片段和 *Hyg* 基因依次连接到 pET20b-*up-TAP* 重组质粒上，最终获得含有敲入片段的重组质粒 pET20b-*up-TAP-Hyg-down*(图 2b, c)．最后经过 PCR 扩增或者双酶切的方法获得 TAP 标签敲入基因组所需的 cassette (图 2d)，并作胶回收处理．接着通过电击转化将回收到的 cassete 转入带有重组工程系统的耻垢分枝杆菌感受态细胞内，将 TAP-tag整合到耻垢分枝杆菌基因组上 *MutM* 基因的 3′端.

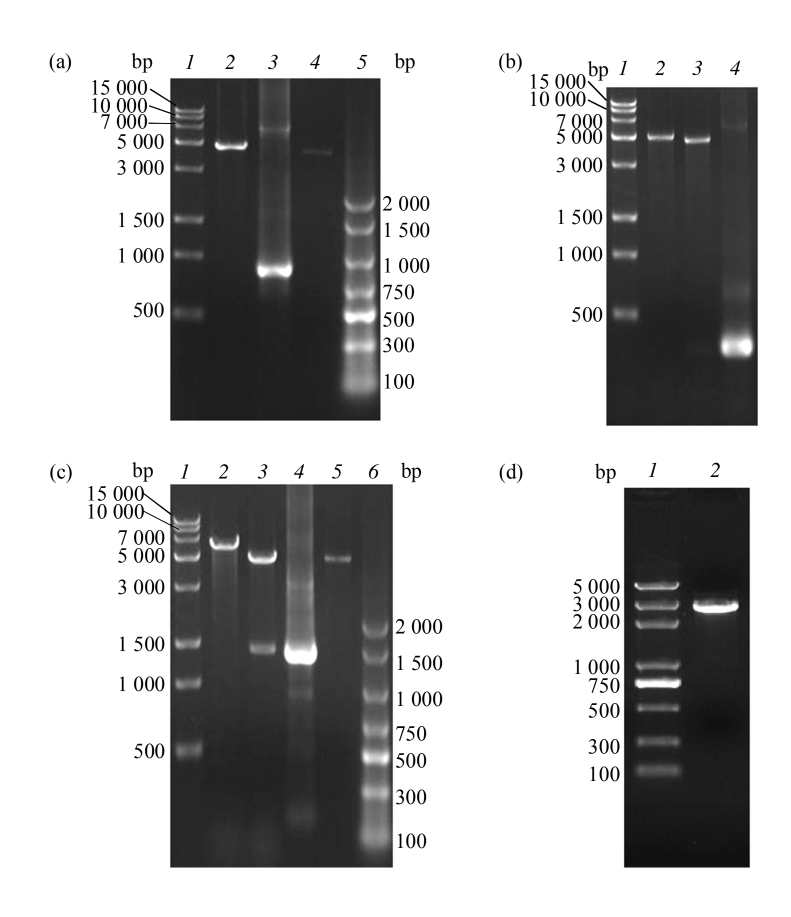


Fig. 2　Construction of a plasmid containing the TAP tag knock-in cassette

(a) Single digestion, double digestion and PCR of the pET20b/*up-TAP* recombinant plasmid. Lane *1*, Marker 1; Lane *2*, *Hin*dⅢ digestion of pET20b/*up-TAP*; Lane *3*, PCR of pET20b/*up-TAP*; Lane *4*, *Bam*HⅠ and *Hin*dⅢ digestion of pET20b/*up-TAP*; Lane *5*, Marker 2. (b) Single digestion, double digestion and PCR of the pET20b/*up-TAP-down* recombinant plasmid. Lane *1*, Marker 1; Lane *2*, *Xho*Ⅰ digestion of pET20b/*up-TAP-down*; Lane *3*, *Xho*Ⅰ and *Not*Ⅰ double digestion of pET20b/*up-TAP-down*; Lane *4*, PCR of pET20b/*up-TAP-down*. (c) Single digestion, double digestion and PCR of the pET20b/*up-TAP-Hyg-down* recombinant plasmid. Lane *1*, Marker 1; Lane *2*, *Hin*dⅢ digestion of pET20b/*up-TAP-Hyg-down*; Lane *3*, *Hin*dⅢ and *Not*Ⅰ double digestion of pET20b/*up-TAP-Hyg-down*; Lane *4*, PCR of pET20b/*up-TAP-Hyg-down*. (d) PCR of knock-in cassette. Lane *1*, Marker; Lane *2*, PCR of knock-in cassette.

2.2　PCR 和 Western blot 验证 TAP-tag 标签的敲入

为确保单克隆重组成功，我们利用 PCR技术对这些重组子进行 DNA 水平上的验证．如图 3a 所示，共设计了 2 对引物，其中 1 对的 1 条引物 a 来自同源臂外侧，另 1 条引物 b 来自 TAP-tag 片段内部，只有整合了 TAP-tag 的重组子才能扩增出相应大小的条带，而野生型菌是无法扩增出条带的；同时，利用另外 1 对引物验证 *MutM* 基因的 3′端 300 bp 非编码区片段是否同源重组成功，其中 1 条引物 c 来自 *Hyg* 基因内部，另 1 条引物 d 来自 *MutM* 基因的 3′端 300 bp 非编码区片段外侧，也是只有整合了 TAP-tag 的重组子才能扩增出相应大小的条带，而野生型菌是无法扩增出条带的．在图 3b 中的条带大小正好验证了这一结果，证明成功地将 TAP-tag 片段敲入到基因组上 *MutM* 基因的 3′端．

由于在基因组上 *MutM* 基因的 C 端整合进去了一段外源序列，基因组的部分结构可能发生改变从而影响蛋白质表达．为了验证基因敲入菌株是否能正确表达融合了 TAP-tag 的 MutM 蛋白，我们利用抗 TAP-tag 的抗体进行了 Western blot 检测．从图 3c 中可见，重组子能够表达带有 TAP-tag 标签的 MutM 蛋白，而在含有 pSMT3-*TAP tag* 质粒的耻垢分枝杆菌中只能检测到 TAP-tag．实验结果表明 MutM 蛋白融合有 TAP 标签可以获得正确表达．

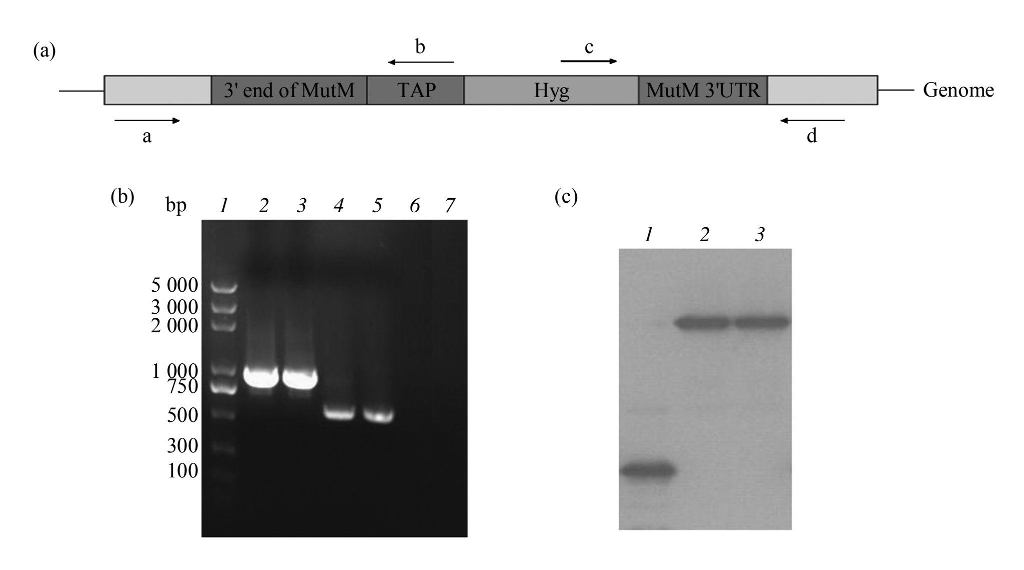


Fig. 3　Identification of *M. smegmatis* strains with a TAP tag knocked into the C terminal of *mutM* by PCR and Western blotting

(a) PCR primers used for verifying *M. smegmatis* strains with a knocked-in TAP tag. Colonies were examined by PCR using either primers a and b (no product for wild type *M. smegmatis*, 914 bp for *M. smegmatis* strains with a knocked-in TAP tag) or primers c and d (no product for wild type *M. smegmatis*, 556 bp for *M. smegmatis* strains with a knocked-in TAP tag). (b) PCR analysis of wild type *M. smegmatis* and *M. smegmatis* strains with knocked-in TAP tags using two pairs of specific primers. Lane *1*, DNA marker; Line *2* and *3*, PCR analysis of two *M. smegmatis* strains with knocked-in TAP tags using primers a and b; Lane *4* and *5*, PCR analysis of two *M. smegmatis* strains with a knocked-in TAP tag using primers c and d; Lane *6*, PCR analysis of wild type *M. smegmatis* using primers a and b; Lane *7*, PCR analysis of wild type *M. smegmatis* using primers c and d. (c) Western blot of MutM-TAP tag expression in *M. smegmatis*/pMST3-TAP tag and *M. smegmatis* strains with a knocked-in TAP tag using anti-TAP tag antiserum. Lane *1*, *M. smegmatis*/pMST3-TAP tag; Lane *1* and *2*, two *M. smegmatis* strains with knocked-in TAP tags.

2.3　MutM 蛋白串联亲和纯化及互作蛋白的质谱鉴定

本研究所使用的 TAP tag 包含有 Protein A 和 CBP 标签两部分，二者用 TEV 酶切位点隔开[14]. 先用 IgG Sepharose 玻璃珠材料结合标签上的 Protein A 蛋白，经过 TEV 蛋白酶切割去掉 Protein A 标签后，再用和 calmodulin 玻璃珠材料结合剩下的标签，经过洗脱后，得到最终的结合蛋白，经过 SDS-PAGE 分离后，再用银染方法显色(图 4)，结果显示，与对照组相比有明显差异的条带. 选取银

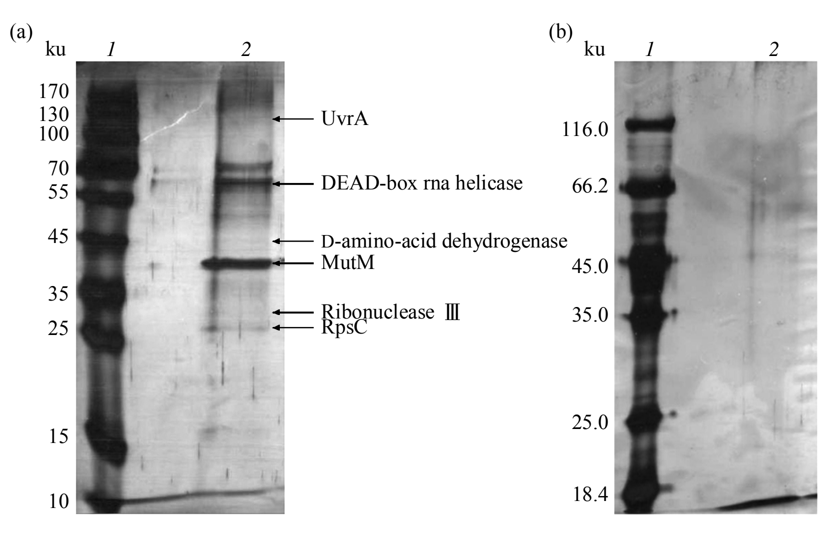


Fig. 4　TAP purification of MutM-TAP (TAP-tag at the C-terminus) by affinity chromatography with Protein A and calmodulin

Protein complexes were visualized by silver staining after separation by SDS-PAGE. Several specific bands were excised and subjected to mass spectrometry. (a) TAP purified proteins after silver staining. Lane *1*, Protein molecular weight marker; Lane *2*, TAP-tagged MutM complex. (b) TAP purified proteins after silver staining (Control). Lane *1*, Protein molecular mass marker; Lane *2*, Control - TAP tag alone.

染后的差异蛋白条带，经过胰酶降解后，进行质谱鉴定(表 3)．结果显示，除了靶蛋白 MutM，还鉴定出 5 种至少含有 2 条酶解片段的蛋白(图 4b)，分别为 UvrA (excinuclease ABC subunit A)、DEAD-box rna helicase (编码基因为 *MSMEG_5042*)、D-amino-acid dehydrogenase (编码基因为 *MSMEG_6291*)、RpsC (30S ribosomal protein S3，编码基因为 *MSMEG_1442*) 和 Rubonuclease Ⅲ (编码基因为 *MSMEG_2418*)．这些蛋白中 UvrA 主要参与核苷酸切除修复途径，DEAD-box rna helicase 和 Rubonuclease Ⅲ 主要参与 RNA 的代谢，D-amino-acid dehydrogenase 主要参与氨基酸代谢，RpsC 是核糖体 16S 亚基的组成部分．它们与 MutM 相互作用的机制都需要进一步研究．

Table 3　Peptides identified by mass spectrometry

Protein	Peptide
DEAD-box rna helicase	K.YLHDPVEVTVK.A
(ATP-dependent rna helicase, dead/deah box	R.NEFGHITIR.L
family protein[*Mycobacterium smegmatis* str.	R.SGHAVLFVTPR.E
MC2 155])	K.VGPGHIVGAIANEGGLHR.N
	R.ISGVLINLQPDRGPR.R
	R.ISGVLINLQPDR.G
	R.LDYSLVELPEKLPK.K
	K.TAAFAIPILSK.I
Ribonuclease Ⅲ [*Mycobacterium smegmatis* str.	R.SYSYENGGLPTNER.L
MC2 155]	K.SSLQELTAAR.G
	K.LRASIVNTQALADVGR.G
	R.ASIVNTQALADVGR.G
	R.GLTDEGLGAHLFLGKGEENSGGADK.S
	R.GLTDEGLGAHLFLGK.G
D-amino-acid dehydrogenase [*Mycobacterium*	R.MADLGQDVK.F
smegmatis str.　MC2 155]	R.GVDVTVVDR.T
	R.TGEVLDVQPSKPGVR.I
	R.FVHALADAVVAR.G
	R.GYSFTVPVDRPVPTPIYLPDAR.V
RpsC	R.ELAAAAPASDRPR.R
(30S ribosomal protein S3 [*Mycobacterium*	R.KLLATGLER.A
smegmatis str.　MC2 155])	
UvrA	R.SNPATYTGVFDKIR.S
(Excinuclease ABC subunit A [*Mycobacterium*	R.STVGTITEVYDYLR.L
smegmatis str.　MC2 155])	

2.4　Far western 和 GST pull-down 验证 MutM 与质谱鉴定的蛋白质具有直接的相互作用

我们将鉴定的可能与 MutM 相互作用的蛋白质进行了克隆、表达和纯化，其中 D-amino-acid dehydrogenase 和 Rubonuclease Ⅲ 为不可溶性表达，UvrA、DEAD-box rna helicase 和 RpsC 都获得了可溶性蛋白．将 SBP 标签和 GST 标签分别融合到 MutM 蛋白的 C 端和 N 端，并进行表达纯化，最后用 Far western 和 GST pull-down 方法对 UvrA、DEAD-box rna helicase、RpsC 与 MutM 的相互作用进行了验证．Far western 实验结果显示，随着 3 种蛋白质浓度的降低，结合 MutM-SBP 的量逐渐减少，作为对照，BSA 和 SBP 标签都不能结合 SBP-MutM (图 5)，说明 UvrA、DEAD-box rna helicase、RpsC 和 MutM 之间存在着直接的相互作用．GST pull-down 实验结果显示 GST-MutM 蛋白可以钓出 UvrA、DEAD-box rna helicase 和 RpsC，而 GST 蛋白却不能钓出任何蛋白(图 6)，说明

UvrA、DEAD-box rna helicase、RpsC 和 MutM 确实有直接的特异的相互作用.

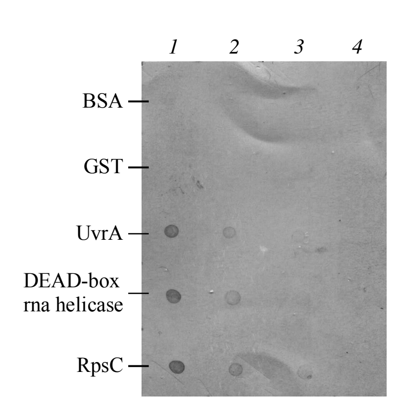


Fig. 5 Far western analysis of interactions between MutM and UvrA, DEAD-box rna helicase and RpsC

UvrA, DEAD-box rna helicase, RpsC and BSA or GST were applied to a nitrocellulose membrane at different concentrations (8～0 μmol/L, from left to right) and then incubated with MutM-SBP. BSA and GST were set as negative controls. MutM-SBP bound to the membrane was detected by sequentially incubating with a streptavidin alkaline phosphatase conjugate and BCIP/NBT. *1*: 8 μmol/L; *2*: 2 μmol/L; *3*: 0.5 μmol/L; *4*: 0.

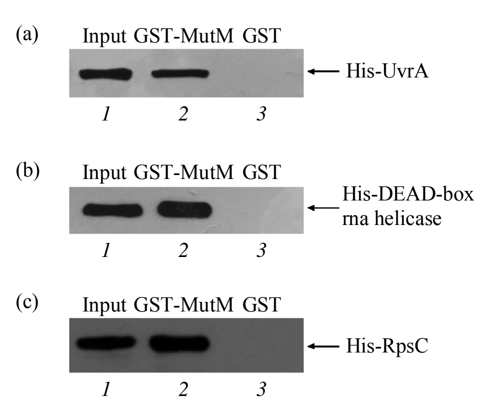


Fig. 6 GST pull-down analysis of interactions between MutM and UvrA, DEAD-box rna Helicase and RpsC *in vitro*

Equimolar amounts of His-UvrA, His-DEAD-box rna helicase or His-RpsC combined with GST-MutM were used for the pull-down assay. GST was used as a negative control. The mixture was incubated for 1 h at 16℃, and then purified by GST affinity. Samples were examined by Western blotting using an anti-His tag antibody. His-UvrA, His-DEAD-box rna helicase and His-RpsC were used as the input in (a)～(c), respectively. (a) *In vitro* interactions between MutM and UvrA detected by the GST pull-down assay. (b) *In vitro* interactions between MutM and DEAD-box rna helicase detected in the GST pull-down assay. (c) GST pull-down analysis of the interaction between MutM and RpsC *in vitro*.

3 讨 论

本研究利用最近建立的分枝杆菌重组系统在基因组水平上将 TAP tag (含有串联的 Protein A 和 CBP 标签)的编码序列插入到 *MutM* 基因的 3′端，使它们在本底水平上融合表达，利用 Protein A 和 CBP 两步纯化的方法将 MutM 和与之有相互作用的蛋白质纯化出来，并通过 SDS-PAGE 分离、银染显色和质谱鉴定，共鉴定出 5 种蛋白，即 UvrA、DEAD-box rna helicase、D-amino-acid dehydrogenase、RpsC 和 Rubonuclease Ⅲ，对这些蛋白质进行表达纯化，只有 UvrA、RpsC、DEAD-box rna helicase 获得了可溶性表达. 最后利用 Far western 和 GST pull-down 两种方法证实了这 3 种蛋白与 MutM 具有直接的相互作用.

UvrA 是原核生物核苷酸切除修复系统 (NER) 中一种具有错误识别和部分切除活性的 ATP 水解酶，可招募 UvrB 到 DNA 损伤部位[20]. NER途径主要对具有化学性质和结构多样性的大体积损伤进行修复，例如由紫外线照射产生的胸腺嘧啶二聚体[21-22]. 在啤酒酵母中，MMR 和 NER 可以协同作用参与 UV 造成的损伤[23]. 在粟酒裂殖酵母研究中发现，C/C 错配的修复必须在 MMR 和 NER 共同参与下才能完成[24]. 结合无论是原核生物中的 MutM，还是真核生物中的 OGG1，都可以结合 C/C 错配[12]，可以推测 C/C 错配的修复可能涉及到 MMR、NER 和 BER 3 个系统的共同参与. 但是分枝杆菌中至今仍未发现错配修复系统 (MMR) 的存在[25]，可以推测在分枝杆菌缺少 MMR 修复途径的情况下，BER 途径和 NER 途径可以协同作用完成一些损伤的修复. 已有报道[26]，大肠杆菌中 MutM 可以和 UvrA 相互作用并参与到 UVC (短波紫外线) 损伤修复中. 由于分枝杆菌基因组的 GC 含量较高，为 65%左右，产生 C/C 错配的几率较其他物种大得多，所以对于 C/C 错配的修复至关重要. 耻垢分枝杆菌中 MutM 与 UvrA 的相互作用是否像大肠杆菌中一样参与 UVC 的修复，同时也可以一起完成对 C/C 错配的修复，这些问题都值得进一步深入研究.

DEAD-box RNA 解旋酶是一个依赖 ATP 的 RNA 解旋酶大家族，广泛地存在于从原核生物的细菌到真核生物的酵母、植物和动物中，参与 RNA 转录、前体 mRNA 剪切、核质运输、蛋白质翻译、RNA 降解等重要的生命活动. 通常认为

RNA 如果掺入 DNA 就会导致 DNA 双螺旋的伤害性破坏，促进基因组不稳定．但是最近研究发现，在一种常见的芽殖酵母细胞内 RNA 可充当模板来修复破坏性极大的 DNA 损伤，DNA 双链断裂[27]；人体中 DDX39 DEAD-box rna helicase 在维持基因组的稳定性中发挥着重要的作用[28]．我们发现的 DEAD-box rna helicase 与作为底物比较广泛的 MutM 的相互作用是否参与到一些损伤的修复途径还需要进一步深入研究．由于耻垢分枝杆菌中 Rubonuclease Ⅲ不可溶，所以无法判断其是直接与 MutM 相互作用还是被 DEAD-box RNA 解旋酶间接地垂钓出来．总之，Rubonuclease Ⅲ与 MutM 的相互作用还有待进一步确定．

30S ribosomal protein S3 是原核生物核糖体小亚基的组成蛋白．已有文献报道，人体中对应的蛋白 RPS3 对 8-oxoG 具有结合活性，并且与 MutM 人体中的同源蛋白 OGG1 存在相互作用[29]，说明 RpsC (Rps3)不仅是一个核糖体组成蛋白，而且可以参与到对 DNA 损伤修复中，影响修复效率．由此可以推测分枝杆菌中 RpsC 与 MutM可能一起完成对某些损伤的修复，但还有待进一步研究．截止到目前，D-amino-acid dehydrogenase 没有参与损伤修复的报道，因此 D-amino-acid dehydrogenase 与 MutM 的相互作用还需要进一步的验证和研究．

综上所述，本研究通过将 TAP 标签融合到 MutM 的 C 端，利用串联亲和纯化的方法成功地对 MutM 相互作用的蛋白进行了分离和质谱鉴定，并通过 Far western 和 GST pull-down 的方法对 UvrA、RpsC 和 DEAD-box rna helicase 进行了验证．我们的发现将为进一步深入研究 MutM 在许多损伤修复中的作用机制提供新的思路和切入点．

参 考 文 献

[1] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature, 1993, **362**(6422): 709-715

[2] Zharkov D O. Base excision DNA repair. Cell Mol Life Sci, 2008, **65**(10): 1544-1565

[3] Baute J, Depicker A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2008, **43**(4): 239-276

[4] Cadet J, Berger M, Douki T, *et al*. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1997, **131**: 1-87

[5] Frommol/Le J C, Banerjee A, Verdine G L. DNA glycosylase recognition and catalysis. Curr Opin Struct Biol, 2004, **14**(1): 43-49

[6] Zharkov D O, Ishchenko A A, Douglas K T, *et al*. Recognition of damaged DNA by *Escherichia coli* Fpg protein: insights from structural and kinetic data. Mutat Res, 2003, **531**(1-2): 141-156

[7] Tajiri T, Maki H, Sekiguchi M. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. Mutat Res, 1995, **336**(3): 257-267

[8] Zhang Q M, Miyabe I, Matsumoto Y, *et al*. Identification of repair enzymes for 5-formyluracil in DNA. Nth, Nei, and MutM proteins of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 2000, **275**(45): 35471-35477

[9] Leipold M D, Muller J G, Burrows C J, *et al*. Removal of hydantoin products of 8-oxoguanine oxidation by the *Escherichia coli* DNA repair enzyme, FPG. Biochemistry, 2000, **39**(48): 14984-14992

[10] Onda M, Hanada K, Kawachi H, *et al*. *Escherichia coli* mutM suppresses illegitimate recombination induced by oxidative stress. Genetics, 1999, **151**(2): 439-446

[11] Coste F, Ober M, Carell T, *et al*. Structural basis for the recognition of the FapydG lesion(2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. J Biol Chem. 2004, **279**(42): 44074-44083

[12] Nakahara T, Zhang Q M, Hashiguchi K, *et al*. Identification of proteins of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* that specifically bind to C/C mismatches in DNA. Nucleic Acids Res, 2000, **28**(13): 2551-2556

[13] Fleck O, Lehmann E, Schar P, *et al*. Involvement of nucleotide-excision repair in msh2 pms1-independent mismatch repair. Nat Genet, 1999, **21**(3): 314-317

[14] Springer B, Sander P, Sedlacek L, *et al*. Lack of mismatch correction facilitates genome evolution in *Mycobacteria*, 2004, **53**(6): 1601-1609

[15] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, *et al*. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat Biotechnol, 1999, **17**(10): 1030-1032

[16] van Kessel J C, Hatfull G F. Recombineering in *Mycobacterium* tuberculosis. Nat Methods, 2007, **4**(2): 147-152

[17] Parish T, Stoker N G. Electroporation of mycobacteria. Methods Mol Biol, 1998, **101**: 129-144

[18] Goude R, Parish T. Electroporation of mycobacteria. J Vis Exp, 2008(15): pii761

[19] Keefe A D, Wilson D S, Seelig B, *et al*. One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. Protein Expr Purif, 2001, **23** (3): 440-446

[20] Truglio J J, Croteau D L, Van Houten B, *et al*. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. Chem Rev, 2006, **106**(2): 233-252

[21] Snowden A, Kow Y W, Van Houten B. Damage repertoire of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease complex includes abasic sites, base-damage analogues, and lesions containing adjacent 5' or 3' nicks. Biochemistry, 1990, **29**(31): 7251-7259

[22] Sancar A. DNA excision repair. Annu Rev Biochem, 1996, **65**: 43-81

[23] Bertrand P, Tishkoff D X, Filosi N, *et al*. Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide

excision repair. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**(24): 14278–14283

[24] Fleck O, Lehmann E, Schar P, *et al*. Involvement of nucleotide-excision repair in msh2 pms1-independent mismatch repair. Nat Genet, 1999, **21**(3): 314–317

[25] Mizrahi V, Andersen S J. DNA repair in *Mycobacterium* tuberculosis. What have we learnt from the genome sequence?. Mol Microbiol, 1998, **29**(6): 1331–1339

[26] Silva-Junior A C, Asad L M, Felzenszwalb I, *et al*. The role of Fpg protein in UVC-induced DNA lesions. Redox report: communications in free radical research, 2012, **17**: 95–100

[27] Keskin H, Shen Y, Huang F, *et al*. Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair. Nature, 2014, **515**(7527): 436–439

[28] Yoo H H, Chung I K. Requirement of DDX39 DEAD box RNA helicase for genome integrity and telomere protection. Aging Cell, 2011, **10**(4): 557–571

[29] Hegde V, Wang M, Deutsch W A. Human ribosomal protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1. Biochemistry, 2004, **43**(44): 14211–14217

MutM Interaction Partners Detected in *Mycobacterium smegmatis* by Tandem Affinity Purification*

FAN Shang-Hua[1,2], ZHOU Ying[2], ZHANG Hong-Tai[2], Joy Fleming[2], YU Zi-Niu[1], ZHANG Xian-En[2]**, BI Li-Jun[2]**

([1] *State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan* 430070, China; [2] *CAS Laboratory of RNA Biology and National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, China)

Abstract MutM (Formamidopyrimidine-DNA glycosylase, Fpg), a bifunctional base excision repair enzyme (DNA glycosylase/AP lyase), is involved in the repair of many kinds of DNA damage, including the formation of 8-oxoguanine, 5-formyluracil, and C/C mismatches, through recognizing DNA damage and removing damaged bases. The mechanisms of MutM involvement, however, with the exception of 8-oxoG, are poorly understood. Here, we identified proteins which interact with MutM in *Mycobacterium smegmatis* using methods of tandem affinity purification and mass spectrometry and used Far-western and GST pull-down analysis to validate the interactions between MutM and DEAD-box rna helicase, RpsC, and UvrA. Results demonstrated that tandem affinity purification is a suitable method for identifying MutM interacting proteins and provided insights into the mechanism by which MutM is involved in DNA damage repair.

Key words *Mycobacterium smegmatis*, BER, MutM, TAP

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0065

*This work was supported by grants from Chinese Ministry of Science and Technology (973 Program) (2011CB910300) and The National Natural Science Foundation of China (31400127).

**Corresponding author.

Bi Li-Jun. Tel: 86-10-64888464, E-mail: blj@ibp.ac.cn

Zhang Xian-En. Tel: 86-10-64888148, E-mail: zhangxe@sun5.ibp.ac.cn

Received: March 12, 2015 Accepted: July 20, 2015